

English Abstract for DE 38198460

S2 1 PN="DE 3819846"

?t s2/9/1

2/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008106443

WPI Acc No: 1989-371554/198951

XRAM Acc No: C89-164518

Detecting HIV protease by cleaving heterologous indicator protein - e.g. beta-galactosidase, useful for assessing activity of protease inhibitors

Patent Assignee: WOLF H (WOLF-I)

Inventor: WOLF H

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 3819846	A	19891214	DE 3819846	A	19880610	198951 B

Priority Applications (No Type Date): DE 3819846 A 19880610

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 3819846	A	10		

Abstract (Basic): DE 3819846 A

A test system which makes it possible to detect HIV-specific protease (I) from its ability to cleave heterologous indicator proteins (II) is new. Also new are (1) gene segments, expressible in procaryotes, contg. genes for (I) and for beta-galactosidase (IIa) or luciferin; (2) expression plasmids contg. these segments and additional (I)-sensitive cleavage sites in regions essential for (II) activity; (3) vectors for expressing these gene segments in eukaryotic (esp. mammalian) cells; (4) recombinant viruses (esp. vaccinia) contg. these gene segments and expressible in infected host cells, and (5) transfected cells which can permanently express (I) and (II).

USE/ADVANTAGE - (II) provides simple and rapid detection (by colour change) of (I), and its inhibitors, in cell systems.

0/4

Title Terms: DETECT; HIV; PROTEASE; CLEAVE; HETEROLOGOUS; INDICATE; PROTEIN ; BETA; GALACTOSIDASE; USEFUL; ASSESS; ACTIVE; PROTEASE; INHIBIT

Index Terms/Additional Words: HUMAN; IMMUNE; DEFICIENT; VIRUS

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): C12N-015/00; C12P-019/34; C12Q-001/34

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02B1; B04-B02B4; B04-B02C3; B04-B04A1; B04-B04A6; B04-B04F; B06-D01; B11-C07B1; B12-K04A4; D05-C03C; D05-C12; D05-H03B; D05-H04; D05-H06; D05-H09; D05-H12

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M750 M903 N102 Q233 V500 V560 V802 V803 V814
02 M423 M760 M903 N102 Q233 V754
03 M423 M710 M903 Q233 V500 V540 V560 V753
05 M423 M430 M782 M903 N102 P831 Q233 V802 V815

Chemical Fragment Codes (M2) :

06 D011 D023 D601 F012 F013 F014 F015 F016 F123 H4 H404 H423 H481 H5
H521 H6 H602 H603 H642 H8 K0 L8 L815 L821 L831 M1 M126 M141 M280
M311 M321 M342 M373 M391 M412 M430 M511 M521 M530 M540 M782 M903
M904 N102 P831 Q233 R11714-D R11714-M

Chemical Fragment Codes (M6) :

04 M903 P831 Q233 R514 R515 R521 R533 R613 R623 R624 R627 R632 R639

Specific Compound Numbers: R11714-D; R11714-M

Test system for developing HIV protease inhibitors

Patent Number: DE3819846

Publication date: 1989-12-14

Inventor(s): WOLF HANS PROF DR DR (DE)

Applicant(s):: WOLF HANS PROF DR DR (DE)

Requested Patent: DE3819846

Application Number: DE19883819846 19880610

Priority Number(s): DE19883819846 19880610

IPC Classification: C12N15/00 ; C12P19/34 ; C12Q1/34

EC Classification: C12Q1/37

Equivalents:

Abstract

It was proposed in Patent Application P 3800233.7 to test the HIV protease for example using the authentic autologous substrate, the gag precursor molecule of human immunodeficiency virus. Even more suitable for screening tests would be a test system which permits the activity of HIV protease to be determined by an easily detectable signal. In this application, active enzymes are introduced as substrate of HIV protease, in such a form that these enzymes are preferentially coexpressed with the protease on a recombinant plasmid or the viral protease from recombinant host cells is admixed. The protease is then detected indirectly via the activity of the enzyme remaining after proteolytic action.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑯ Offenlegungsschrift

⑯ DE 3819846 A1

⑯ Int. Cl. 4:

C 12 Q 1/34

C 12 P 19/34

C 12 N 15/00

⑯ Aktenzeichen: P 38 19 846.0
⑯ Anmeldetag: 10. 6. 88
⑯ Offenlegungstag: 14. 12. 89



DE 3819846 A1

⑯ Anmelder:

Wolf, Hans, Prof. Dr. Dr., 8130 Starnberg, DE

⑯ Erfinder:

gleich Anmelder

⑯ Testsystem für die Entwicklung von Inhibitoren der Protease von HIV

In der Patentanmeldung P 3800233.7 wurde vorgeschlagen, die HIV Protease z. B. unter Einsatz des authentischen autologen Substrats, des gag Vorläufermoleküls des humangen Immundefizienzvirus zu testen.

Für Massenteste noch besser geeignet wäre ein Testsystem, das durch ein leicht nachweisbares Signal die Bestimmung der Aktivität der HIV Protease erlaubt. In dieser Anmeldung werden aktive Enzyme als Substrat der HIV Protease eingeführt, in der Form, daß diese Enzyme präferentiell mit der Protease auf einem rekombinanten Plasmid coexpressiert oder der viralen Protease aus rekombinanten Wirtszellen zugemischt wird. Der Nachweis der Protease erfolgt dann indirekt über die nach proteolytischer Einwirkung verbleibende Restaktivität des Enzyms.

DE 3819846 A1

Beschreibung

Als ein Vertreter der humanen erworbenen Immunodefizienz (AIDS) sowie deren Vorstadien wurde ein Retrovirus ermittelt, dessen verschiedene Isolate zunächst "humanes T-lymphotropes Retrovirus III (HTLV III), Lymphadenopathie-Virus (LAV) oder AIDS-assoziiertes Retrovirus (ARV) benannt wurden, die aber inzwischen unter dem Sammelbegriff HIV (Humanes Immundefizienz Virus) vereinigt wurden. Die komplette genetische Information einer Reihe verschiedener Isolate ist inzwischen bestimmt worden (z.B. Ratner et al, *Nature*, 313, (1985), 277 – 284; Wain-Hobson et al, *Cell*, 40, (1985), 9 – 17; Muesing et al, *Nature*, 313, (1985), 450 – 458; Sanchez-Pescador et al, *Science*, 277, (1985), 484 – 492; Guyader et al, *Nature*, 326, (1987), 662 – 669).

Die im Virus-Partikel enthaltene Erbinformation in Form von RNA wird nach Infektion von T4-Rezeptor-tragenden Zellen durch eine virale Reverse Transkriptase in DNA umgesetzt und als Provirus in zelluläre Sequenzen integriert. Dieses Provirus ist zwischen 9734bp und 9749bp lang und besitzt an beiden Enden ein LTR (long terminal repeat). In diesen "repeats" sind Sequenzen, welche die Regulation und Initiation der Synthese viraler Produkte steuern. HIV Viren besitzen viele für Retroviren charakteristische genetische Merkmale am 5'-Ende: sitzt nach der LTR-Sequenz das sogenannte gag-Gen (group specific antigen), dann folgen das pol-Gen mit der Protease, die RNA-abhängige DNA-Polymerase (Revertase), die Endonuklease und das Gen für das Hülpprotein (env).

Zusätzlich besitzt das Virus noch einige Protein-kodierende Regionen, die eine Einordnung in die Retrovirus-Untergruppe der Lentiviren erlauben. Es handelt sich dabei um SOR-1, zwischen pol und env gelegen, um 3'-ORF, vor dem 3'-LTR, sowie um TAT und ART, deren kodierenden Regionen getrennt auf kurzen Leserahmen vor und nach dem env-Gen liegen und deren m-RNA durch "splicing" entstehen.

SOR-1, 3'-ORF, TAT und ART sind Regulationsproteine, die für Latenz des Provirus in der Zelle sowie das Anschalten der Virussynthese auf transkriptioneller und translationeller Ebene verantwortlich sind.

Das HIV-1 gag-Gen wird als 512 Aminosäure langes Protein translatiert und anschließend durch eine virale Protease in die gag-Proteine p 17, p 24 und p 15 gespalten. Diese Strukturproteine bilden die virale Proteinhülle (core) in das die RNA und Reverse Transkriptase eingelagert werden.

Das pol-Gen wird ebenfalls als ein Polyprotein-Vorläufer translatiert und dann in die Protease, die reverse Transkriptase sowie eine Endonuklease (Integrase) durch eine virale Protease prozessiert.

Als weiteres Strukturprotein sitzt das env-Genprodukt in der von der infizierten Zelle stammenden Lipiddmembran. Das glykosylierte Protein wird als 160kDa großer Vorläufer (gp 160) synthetisiert und in gp120 und gp41 gespalten. Die nach bisherigen Erkenntnissen gewonnene Vorstellung geht davon aus, daß gp120 keine Membranverankerung aufweist und nur durch Wechselwirkung an das gp41 gebunden ist. Das gp41 ist als Transmembranprotein in der Lipidschicht verankert, wobei wahrscheinlich der N-terminale Teil außerhalb der Zelle liegt.

gp120 scheint für die spezifische Anlagerung an den T4-Rezeptor der Zielzelle verantwortlich zu sein, während gp41 wahrscheinlich die Fusion der Membranen und damit das Eindringen in die Zelle mittels hydropho-

ber Bereiche am N-terminalen Ende bewerkstelligt.

Die Übertragung von HIV erfolgt in den allermeisten Fällen durch direkten Blut-Blut Kontakt. Eine Erstinfektion kann asymptomatisch verlaufen, in vielen Fällen kommt es, bedingt durch eine Virämie, zu Grippe-artigen Symptomen.

Nach einem Zeitraum im Durchschnitt von einigen Wochen bis Monaten sind Antikörper gegen virale Proteine im Serum nachweisbar. Der Erreger selbst bleibt aber über Jahre hinweg in T4-Rezeptor-tragenden Zellen latent vorhanden. Durch nur in Ansätzen verstandene Ereignisse werden die in das Genom integrierten Viren wieder aktiviert und es kommt zu einer Elimination von T4-Zellen. Als Symptome treten Lymphknoten-Schwellungen, Fieber, Gewichtsabnahme und Durchfall auf. Bedingt durch eine Infektion von Zellen des Hirnstamms kann es teilweise zu einer Demenz kommen. Schließlich erfolgen aufgrund einer fortschreitend reduzierten zellulären Immunantwort schwere opportunistische Infektionen, die das Vollbild von AIDS ergeben und in allen bekannten Fällen mit dem Tod endet.

HIV-Protease und Möglichkeiten zur Inhibition

Die Protease, die von einer DNA-Sequenz kodiert wird, die sich am 5'-Ende der pol-Gen-Sequenz befindet, katalysiert ihre eigene Abspaltung sowie die Prozessierung der Revertase und Endonuklease, aber auch des gag-Vorläufermoleküls. Vergleichende Sequenzuntersuchungen (Pearl et al, *Nature*, 329, (1987), 351 – 354) legen den Schluß nahe, daß es sich bei der HIV-Protease, ähnlich wie bei den meisten retroviralen Proteasen, um eine zur Gruppe der Aspartyl-Säure Proteasen gehörendes Enzym handelt. Die Aminosäure Sequenz Asp-Thr(Ser)-Gly ist eine konservierte Domäne innerhalb der bekannten Aspartyl-Proteasen und ist an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligt. Während bekannte Aspartyl-Protease aus Proteinsequenzen mit 2 konservierten Asp-Thr(Ser)-Gly-Domänen und mehr als 300 Aminosäuren bestehen, sind retrovirale Proteasen soweit bekannt zum Teil um mehr als die Hälfte kürzer und beinhalten nur ein aktives Zentrum.

In Analogien zu bekannten Protease-Sequenzen und deren dreidimensionaler Struktur (Röntgen-Struktur-Analyse) war es möglich, ein Modell der HIV-Protease zu erstellen. Dies und die Sequenzaufklärung der Protease-spezifischen Spaltsequenzen (Pearl et al, *Nature*, 328, (1987), 482) können zu rational konstruierten Inhibitoren führen.

Inhibitoren der Proteasewirkung können bis jetzt nur im HIV-Eukaryontenzell-System überprüft werden, und sind mit allen Nachteilen und Gefahren der Hantierung mit aktivem HIV belastet. Deshalb sind effiziente, rasche, aussagekräftige neue Testsysteme unter Verwendung rekombinanter Proteine erforderlich. Diese erlauben in vivo bzw. in vitro, in nicht durch die Menge an Substrat und Enzym limitierten Testansätzen, Substanzen auf eine spezifische Inhibition der Protease zu prüfen.

Beschreibung der Erfindung

Eine Möglichkeit einfach und schnell im Zellsystem die Wirkung der HIV-Protease bzw. deren Inhibition nachzuweisen, besteht in der Verwendung von Protease-Substraten (z.B. Enzymen), durch deren spezifische, Protease katalysierte Spaltung ein einfacher visueller

Nachweis (Farbumschlag) möglich ist. Gemeint ist dabei die Koexpression von Substraten bzw. Enzymen zusammen mit der aktiven Protease sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen. Diese Substrate bzw. Enzyme können bereits natürliche HIV-Protease spezifische Spalt-Sequenzen enthalten. Durch gerichtete Mutagenese bzw. Austausch oder Insertion von Spaltsequenzen mit den üblichen molekulargenetischen Methoden können darüber hinaus solche Spaltstellen zusätzlich eingeführt werden.

An folgendem Beispiel soll diese Möglichkeit der Testung von spezifischen Inhibitoren dargestellt werden. Das Enzym β -Galaktosidase ist am zellulären Stoffwechsel von β -Galaktosiden beteiligt und spaltet dabei z.B. das Disaccharid Laktose in seine monomeren Bestandteile Galaktose und Glukose. Ebenso wird von diesem Enzym z.B. die Spaltung eines zunächst farblosen Substrats wie 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-gal) katalysiert. Dabei entsteht ein blaugefärbtes Produkt. Durch Expression der enzymatisch aktiven β -Galaktosidase in bakteriellen oder eukaryotischen Zellen kommt es bei Zugabe von X-gal zu blaugefärbten Kolonien bzw. Plaque-Arealen (siehe Abb. 3). Wird nun diese β -Galaktosidase spezifisch gespalten, d.h. deren Aminosäure-Sequenz an einer definierten Stelle unterbrochen, kommt es nach Zugabe von X-gal zu keiner Blaufärbung. Durch Einführung von Spalt-Sequenzen mit Spezifität für HIV-Protease in die kontinuierliche Aminosäurenfolge der β -Galaktosidase, ohne daß es dabei zu einer substantiellen Veränderung der enzymatischen Aktivität kommt, kann durch Zugabe bzw. Koexpression der HIV-Protease in cis- oder trans Konfiguration eine Spaltung der β -Galaktosidase erreicht werden, mit der Folge der Zerstörung der Enzymaktivität (s. Abb. 1). Durch Zugabe von HIV-Protease Inhibitoren würde diese Spaltung verhindert und damit die β -Galaktosidase-Enzymaktivität aufrecht erhalten. Bei gleichzeitiger Expression von aktiver Protease und "veränderter" β -Galaktosidase (zusätzliche Spalt-Sequenzen für die HIV-Protease) in geeigneten Zellen kommt es also zu einer Spaltung bzw. Zerstörung der β -Galaktosidase Aktivität und damit zu farblosen Kolonien (siehe Abb. 3). Können nun geeignete Protease-Inhibitoren gefunden werden, bleibt die β -Galaktosidase aktiv und es kommt zu einer Umsetzung des Substrats X-gal und damit zu blauen Kolonien. Ein einfaches, visuelles Test-System kann somit etabliert werden.

Zu diesem Zweck wurde ein Expressionsplasmid pUR288Prt (Abb. 2) erzeugt welches die genetische Information für eine vollständige β -Galaktosidase enthält. An diese Sequenz wurde eine, die vollständige aktive HIV-Protease enthaltende Sequenz fusioniert. Die Fusion geschah in der Weise, daß ein ununterbrochener Leserahmen für ein Protein bestehend aus β -Galaktosidase und HIV-Protease erzeugt wurde. Der für die Protease kodierende Anteil wird aminoterminal und carboxyterminal von HIV-Protease spezifischen Spalt-Sequenzen flankiert.

Nach Expression in Ecoli können in beschriebener Weise die Expressionsprodukte im Western-Blot mit einem humanen HIV-Pool Serum nachgewiesen werden. Dabei ist zu beobachten, daß die HIV-Protease ihre eigene Abspaltung von dem β -Galaktosidase Anteil katalysiert, wie dies auch zu erwarten ist. Es entsteht also nicht ein 126 kD großes Fusionsprotein, sondern unter anderen Spaltprodukten ist die Protease mit etwa 10 kD wird nachweisbar. Aufgrund der Sequenzdaten kann weiter erwartet werden, daß auch die β -Galaktosidase

an mindestens einer Spaltstelle (natürlich vorhanden) gespalten wird. Dies kann auch aus der stark verminderten Enzymaktivität und damit reduzierter Blaufärbung (siehe oben und Abb. 2) geschlossen werden. Das heißt aber, daß durch die natürlich vorhandene Spaltstelle eine Protease-spezifische Spaltung der β -Galaktosidase erfolgt. Allerdings werden bei der gespaltenen β -Galaktosidase, wenn auch vermindert, noch Enzymaktivitäten beobachtet, wenn die Aminosäure-Sequenz in z.B. 20 Polypeptiden vorliegt (α - bzw. Ω -Komplementation). Allerdings beschränkt sich dies auf bestimmte Proteinbereiche. Aus der Lage der möglichen natürlichen Spaltsequenz könnte dies bei dem beschriebenen Expressionsklon der Fall sein, da es noch zu einer schwachen 15 Blaufärbung kommt. Zur gänzlichen Zerstörung der β -Galaktosidase Enzymaktivität müssen weitere Spaltstellen eingeführt werden (gerichtete Mutagenese) und Wirtsbakterien verwendet werden, die nicht selbst die genetische Information für Segmente der β -Galaktoxidase enthalten.

Das Test-System kann auch mit anderen Indikator-Enzymen wie Luceferin und Substraten in oben beschriebener Weise dargestellt werden.

25 Expression in Eukaryontenzellen durch Gentransfer

Ein besonderer Wert des Systems wird darin gesehen, daß es mit anderen Trägerplasmiden (z.B. pMD III, Motz et al, Gene, 58 (1987) S. 149 – 154)) oder durch 30 retrovirale Vektoren auch in eukaryonten Zellen eingesetzt werden kann (Abb. 3). Dies bietet den Vorteil mögliche Hemmsubstanzen außer auf ihren enzymologisch messbaren Effekt, auch auf deren Membrangängigkeit, ihre Aktivität in der Zelle und ihre Toxizität zu untersuchen.

35 Expression in infizierten Eukaryontenzellen

In besonderen Fragestellungen könnte es nützlich sein Testsubstanzen für die Protease Hemmung in infizierten Zellen zu prüfen. Dieses wird mit dem vorgeschlagenen Prinzip dadurch erreicht, daß Protease und Prokaryonten in Wirtsviren (z.B. Vakzinia, Mackett et al, Journal of Virology, Mar. 1984, p. 857 – 864) einkombiniert werden.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Testsystem für die Entwicklung der Protease von HIV.

Abb. 2: Plasmidkonstrukt für die Expression des β -Galaktosidase-Protease Fusionsgenes.

Abb. 3: Ecoli mit β -Galaktosidase-Gem mit (A) und ohne (B) zusätzlich exprimierte HIV-Protease.

Abb. 4a: pAVB.

Abb. 4b: Retrovirusvektor pNSV,

Abb. 4c: pMD III Vektor zur Expression in CHO-Zellen.

Patentansprüche

1. Ein Testsystem, das es erlaubt HIV-spezifische Protease dadurch nachweisbar zu machen, daß heterologe Indikatorproteine gespalten werden.
2. Ein Testsystem, in dem HIV-Protease und ein heterologes Indikatorprotein gemeinsam in einer Wirtszelle exprimiert werden.
3. Ein Testsystem, in dem Produkte mit den in 2

beschriebenen Komponenten in unterschiedlichen Wirtszellen exprimiert werden.

4. Gensegmente welche Gene von HIV-Protease und β -Galaktosidase oder Luciferin als Indikatormolekül enthalten und in Prokaryoten exprimiert werden. 5

5. Expressionsplasmide, die Indikatormoleküle wie in 4 enthalten, in die zusätzliche HIV-Protease empfindliche Spaltstellen in Regionen eingebaut werden, die für die Aktivität des Indikatorenzyms 10 wichtig sind.

6. Testsysteme nach 1 – 4, die in Prokaryotenzellen exprimiert sind.

7. Testsysteme nach 1 – 4, die in Eukaryotenzellen exprimiert sind. 15

8. Plasmide wie pUC, welche Gensegmente wie in 4 enthalten und die Expression dieser Segmente in Prokaryonten erlauben.

9. Vektoren, die die Einfügung und Expression von Sequenzen wie in Anspruch 4 beschrieben in eukaryonten Zellen und vor allem in Säugerzellen erlauben. 20

10. Rekombinante Viren wie Vaccinia, die ein Konstrukt wie in 4 enthalten und bei Infektion in der Wirtszelle exprimieren. 25

11. Transfizierte Zellen, die permanent einzeln oder getrennt anschaltbar HIV-Protease und β -Galaktosidase oder andere enzymatisch aktive Indikatormoleküle exprimieren.

30

35

40

45

50

55

60

65

Nummer: 38 19 846
 Int. Cl. 4: C 12 Q. 1/34
 Anmeldetag: 10. Juni 1988
 Offenlegungstag: 14. Dezember 1989

3819846

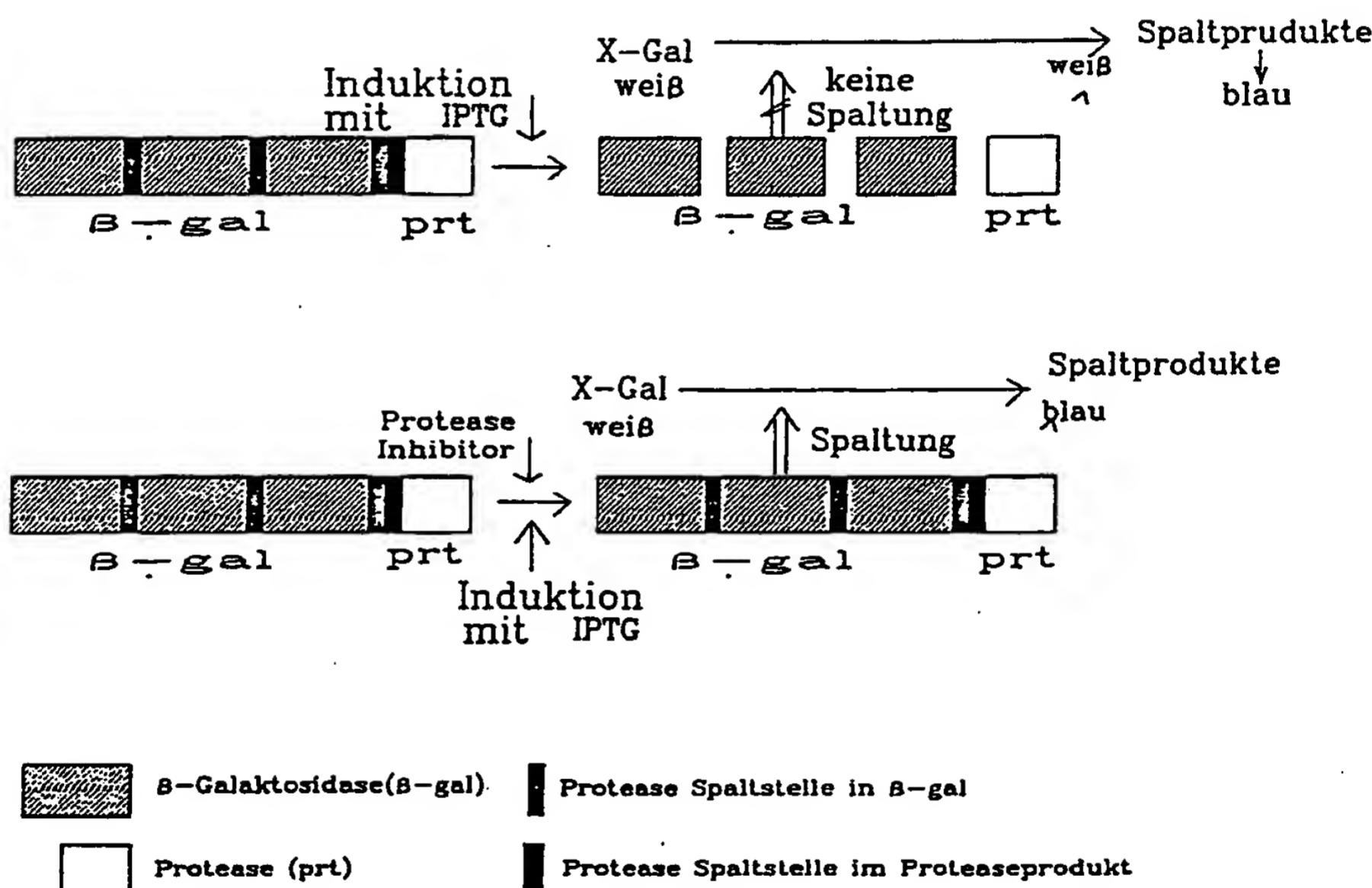
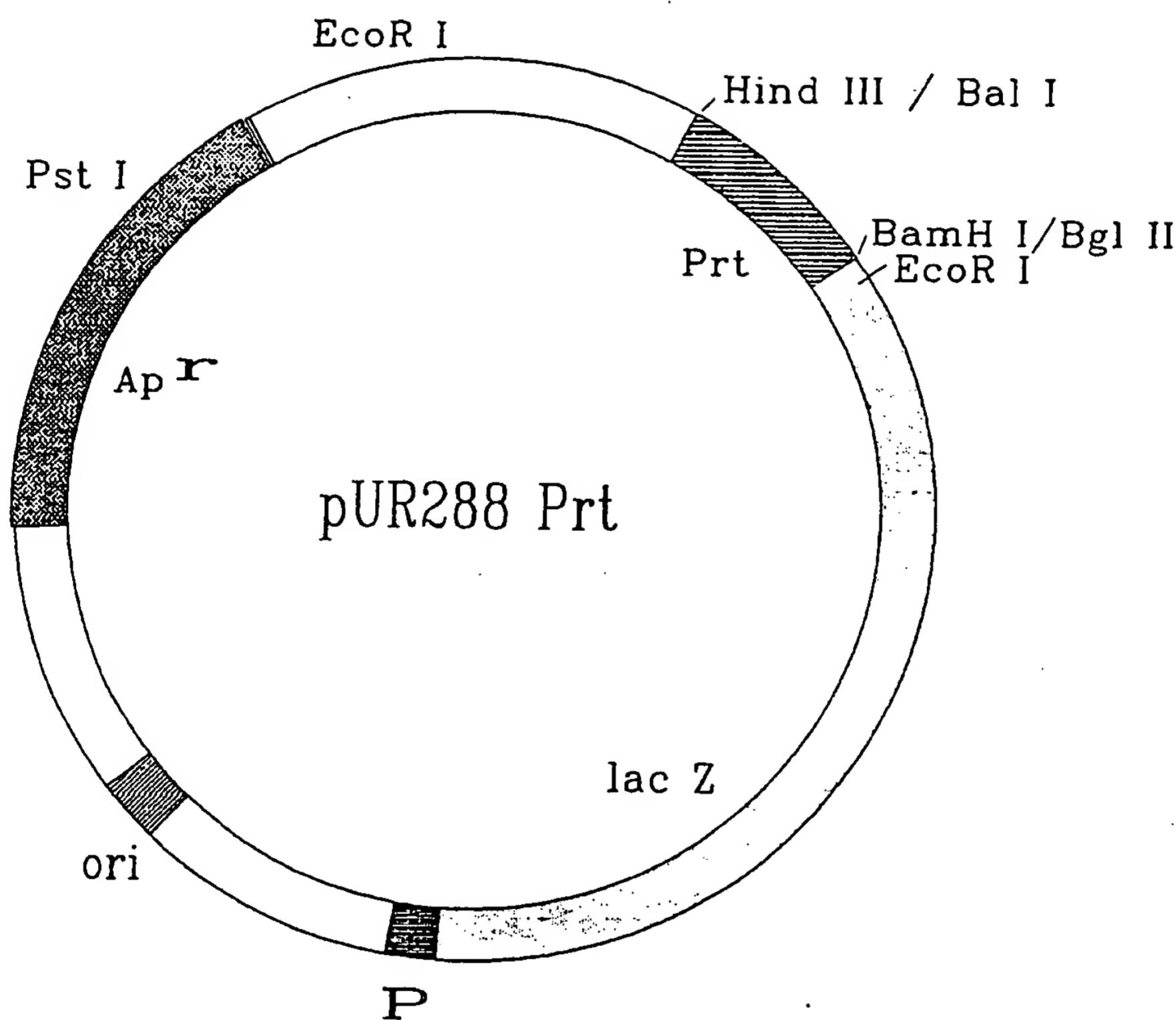


Abb. 1: Testsystem für die Entwicklung von Inhibitoren der Protease von HIV

10.10.88

10

3819846



Vektor zur Exprimierung von heterologen Gensequenzen als Fusionsproteine mit β -Galaktosidase (lac Z):

In diesem Fall wurde die HIV-Protease kodierende Sequenz im gleichen Leseraster an das carboxylterminale Ende der β -Galaktosidase fusioniert.

Abb. 2

Fig. 2

1000000

71

3819846

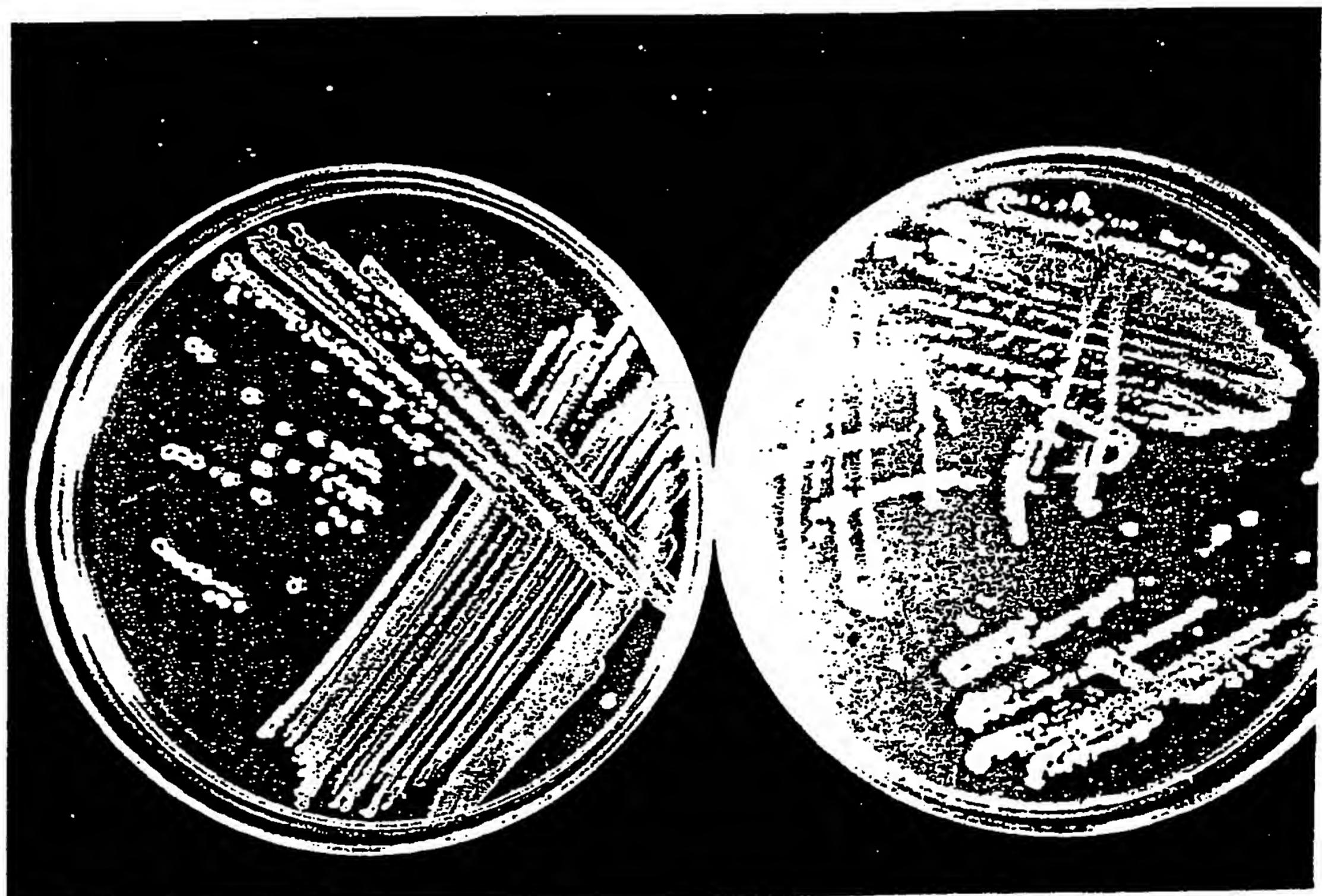
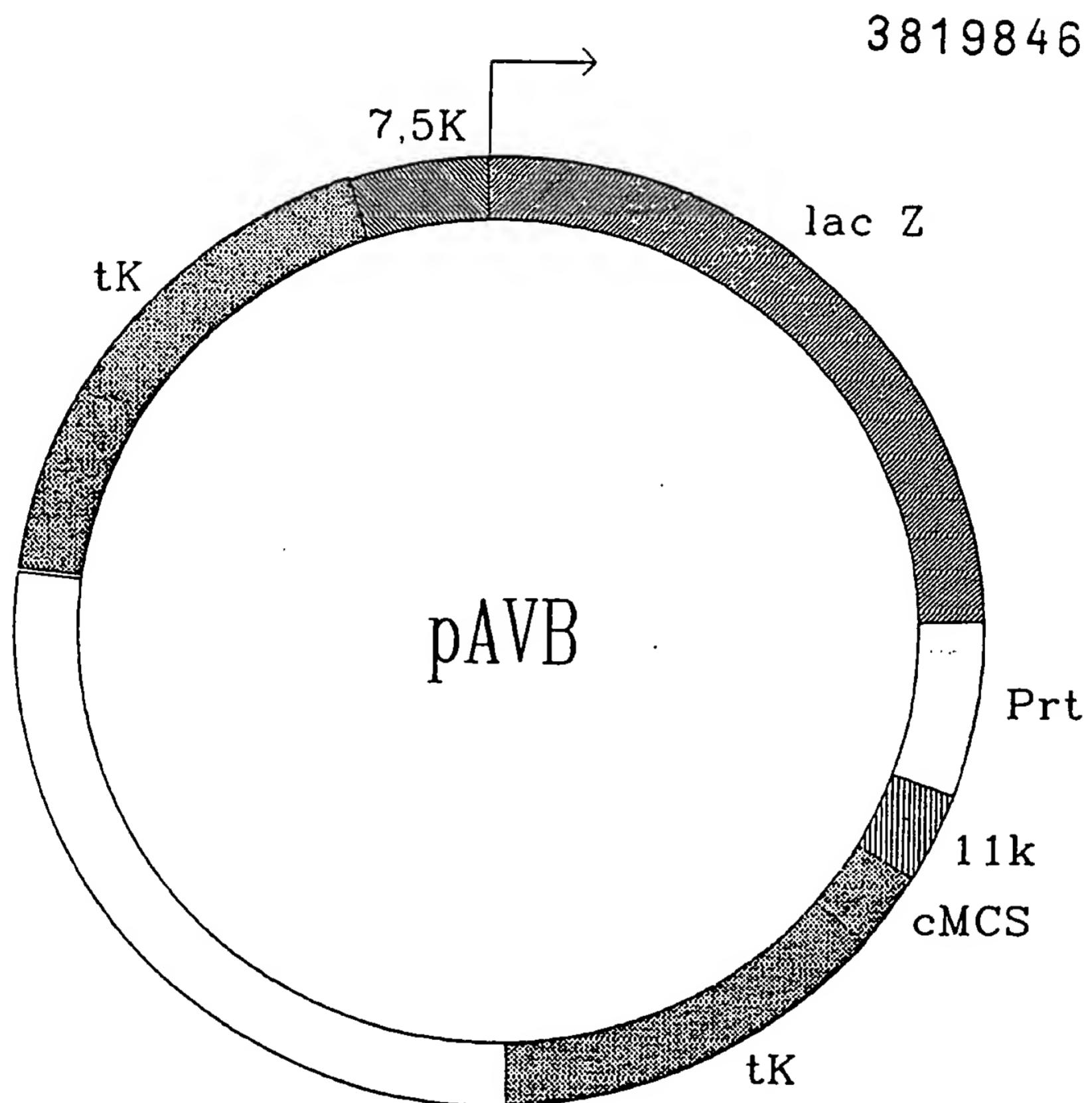


Abb. 3

Fig. 3

10.10.88

12



Vaccinia - Virus - Vektor zur Expression
der β -Galaktosidase-Protease Gencassette

Abb. 4a

Fig. 4a

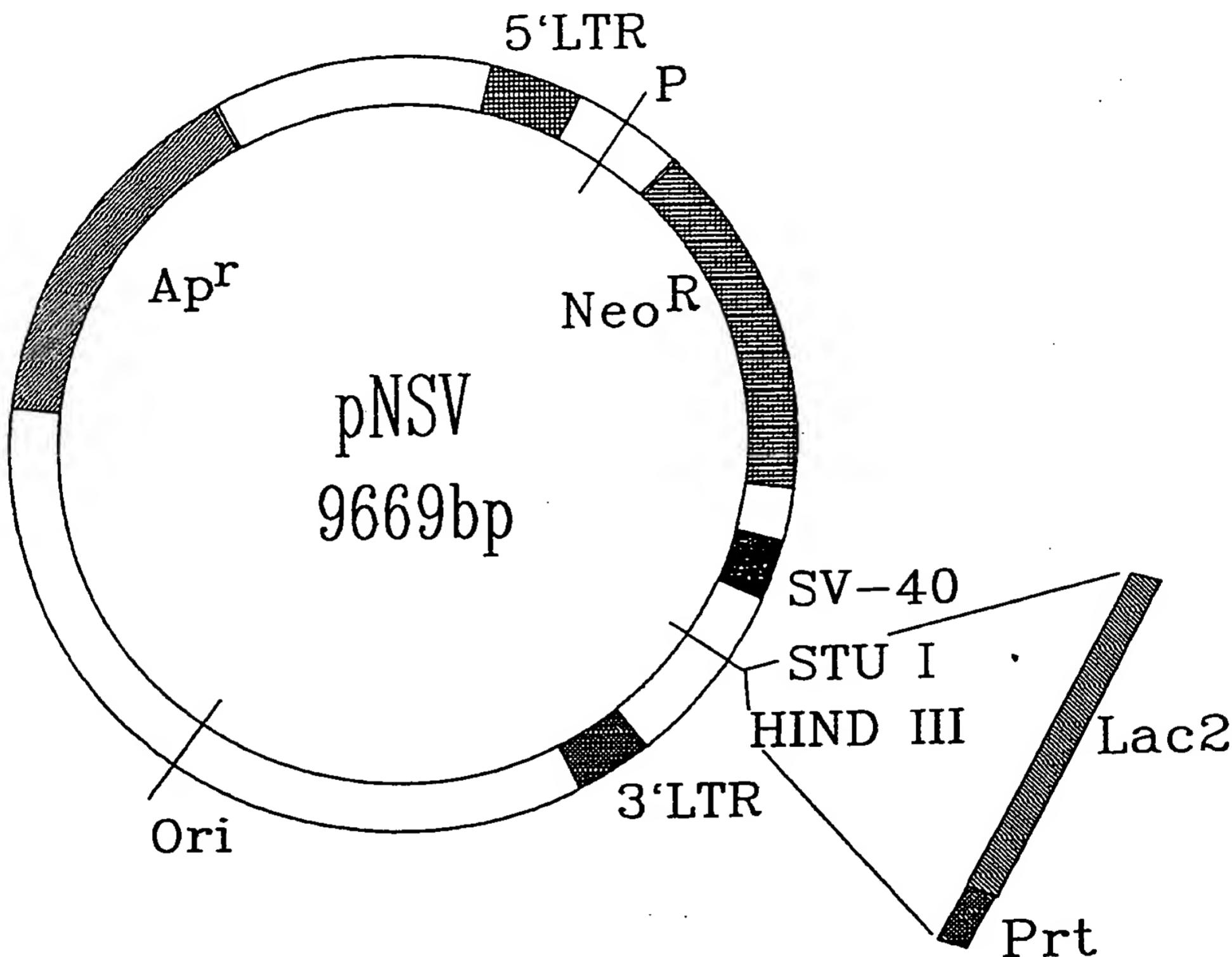
10.06.86

3819846

13

47

Retrovirusvektor pNSV (E.Gilboa, Princeton)



Sequenzen zur Klonierung in Bakterien:

pBR 322 (Deletion Hind III – BamH 1) mit Ampicillin
– Resistenz und origin of replication

Sequenzen zur Expression in Eukaryonten:

Regulationssequenzen 5'LTR des M0-MULV;

Verpackungssignal P; 3'LTR

Selektionsmarker: Neomycinphosphotransferase-Gen
unter Kontrolle des 5'LTR;

Klonierungssite STU I und Hind III zur Einfügung
eines Fremdgenes unter der Kontrolle des frühen SV40
Promotors.

Abb. 4b

Fig. 4b

3819846

74*

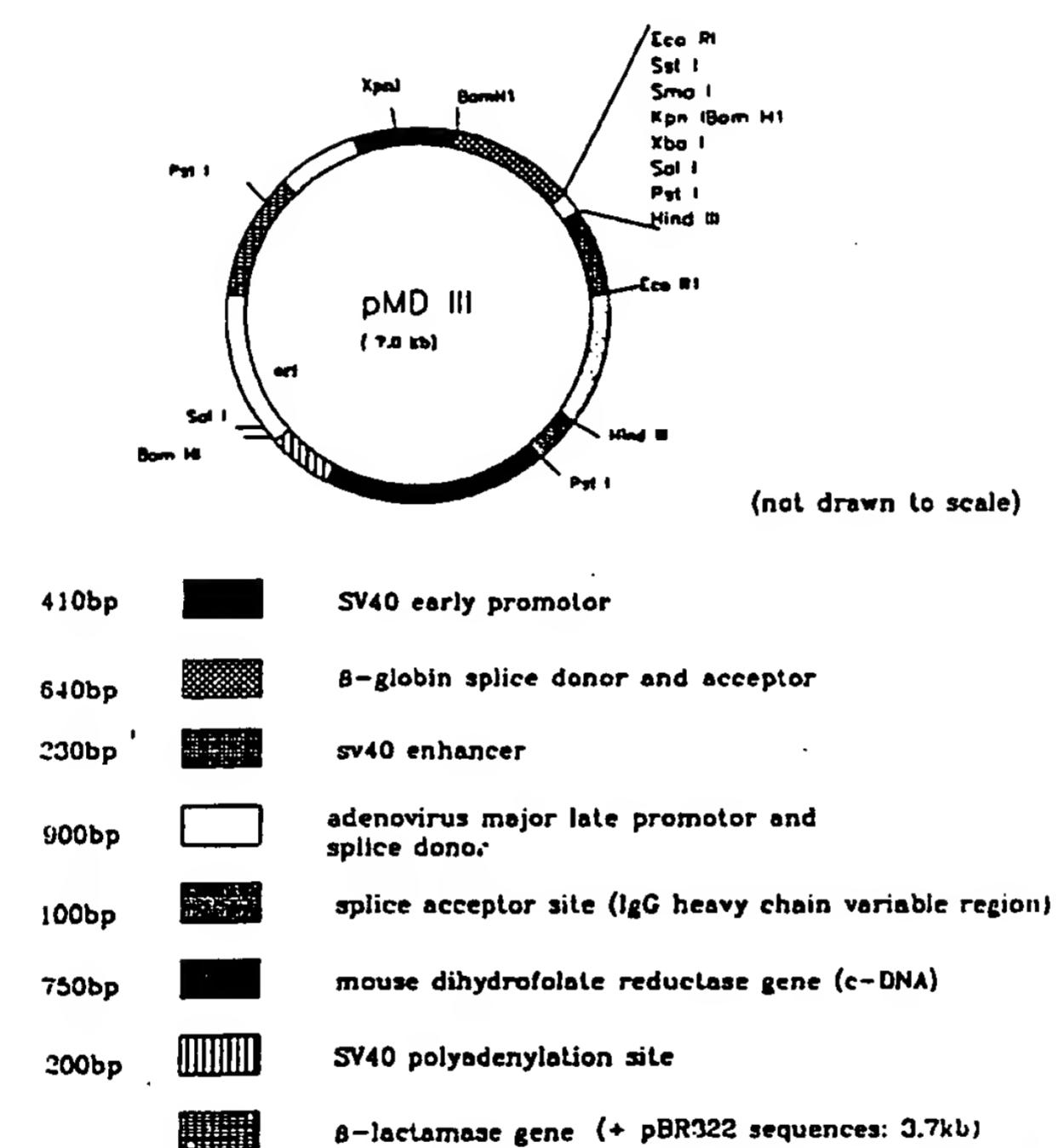


Abb. 4c: pMD III Vektor zur Expression in CHO-Zellen

Fig. 4c